

200/0716

厚生科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

食品由来のウイルス性感染症の検出・予防に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武田直和

平成14 (2002) 年4月

食品由来のウイルス性感染症の検出・
予防に関する研究

目次

I. 総括研究報告書	
食品由来のウイルス性感染症の検出・予防に関する研究	1
	武田直和
II. 分担研究報告書	
1. モノクローナル抗体を用いたノルウォーク様ウイルス検出 ELISA 法の 確立に関する研究	11
	田中智之
2. 下痢症ウイルスの検出法、予防法、汚染指標および疫学に関する研究	19
	谷口孝喜
2. Immunocapture RT-PCR 法による食中毒推定原因食品からのノウォーク ウイルスの検出	27
	榮 賢司
3. 食品媒介性胃腸炎集団発生の背景としての地域における下痢症ウイルス 流行状況に関する研究	33
	大瀬戸光明
5. 小児急性胃腸炎患者における下痢症ウイルスの検討	41
	篠崎邦子
6. 日本の各地から検出されたノウォークウイルスの遺伝子配列について	49
	西尾 治
7. 新規ノウォークウイルス 10 株の遺伝子解析	55
	片山和彦
8. ノウォークウイルス中空粒子および抗血清の作製	65
	名取克郎
9. チバウイルス 3C 様プロテアーゼの活性中心アミノ酸残基の同定と 3次元立体構造解明に向けた結晶化の検討	69
	染谷 雄一
III. 研究成果の刊行に関する一覧	73
IV. ノウォークウイルスの RT-PCR 法 改訂版	175

食品由来のウイルス性感染症の検出・予防に関する研究

主任研究者 武田 直和 国立感染症研究所室長

研究要旨 15 種類の遺伝子型（結果的に 15 種類の血清型）の NLV 構造蛋白を中空粒子として発現し、抗体 ELISA を構築した。Genogroup に特異的な単クローン抗体とポリクローン抗体を併用することによって、14 種類の血清型を検出できる ELISA をキット化し、冬季のウイルス検出に供した。食品中から感度よく NLV を検出するため、磁気ビーズをもちいた innucapture RT-PCR 法を開発した。新たに 10 種類の NLV の全塩基配列を解読した。わが国で検出された NLV の遺伝子配列を詳細に解析した。また、NLV 以外の下痢症ウイルスの流行状況についても詳細に解析した。SLV の遺伝子検出法を確立し、疫学調査をおこなった。G12 ロタウイルスのが自然界で生成したリアソータントであることを証明した。チバウイルスの 3C 様プロテアーゼの活性中心アミノ酸を同定し、X 線結晶構造解析にむけて結晶化を試みた。わが国の高度な NLV 検出技術を維持するため、実際の研究者が実験台において参照できる診断マニュアルを作成して国内の機関に配布した。

分担研究者

田中智之 堺市衛生研究所所長
谷口孝喜 藤田保健衛生大学教授
栄 賢司 愛知県衛生研究所部長
大瀬戸光明 愛媛県立衛生環境研究所室長
篠崎邦子 千葉県衛生研究所上級研究員
西尾 治 国立公衆衛生院室長
片山和彦 国立感染症研究所主任研究官
名取克郎 国立感染症研究所主任研究官
染谷雄一 国立感染症研究所研究員

協力研究者

北元憲利 姫路工業大学教授
小林慎一 愛知県衛生研究所研究員
近藤玲子 愛媛県立衛生環境研究所研究員
山下育孝 愛媛県立衛生環境研究所研究員
吉田紀美 愛媛県立衛生環境研究所研究員
岡田峰幸 千葉県衛生研究所研究員
白土東子 国立感染症研究所研究員
鎌田公仁夫 デンカ生研株式会社研究員

A. 研究目的

わが国において、厚生省研究班および病原

体検出情報で集計した 1990～1994 年、1997 年 1 月～10 月、及び 1997 年 10 月～1999 年 9 月のデータから、ウイルス性集団食中毒を含む食品を介した非細菌性胃腸炎は、実にその 92, 96 及び 97% の事例がノーウォークウイルス (NLV) (SRSLV あるいは小型球形ウイルスと同義語、1999 年の国際ウイルス命名委員会でノーウォークウイルスに統一された) によって引き起こされていることが明らかになってきた。また、これらのおよそ 30% は生ガキによるもので、カキが本疾患の新たな感染源になっていることもわかってきた。したがって、早急にカキの汚染状況を把握し品質管理のシステムを確立する必要がある。またウイルスはカキの中で増殖するわけではないので、NLV のヒトでの伝播経路を明らかにして、カキに濃縮されるまでの経路と汚染状況を解明してその経路を遮断する方策を示すことが必須である。さらに、半分以上の事例は原因となった食品が特定されていないか、原因が全く不明となっている。カキ以外の食品では、含まれるウイルス量が極端に微量であることが原因ウイルス検出の効率が極めて低いレベ

ルにとどまっている第一義の理由である。したがって、より高感度なウイルス検出を開発し、ウイルスの生態を詳細に解析できる手法を確立する必要がある。「磁気ビーズ免疫吸着 RT-PCR 法」の開発に成功したことによって、食品由来のウイルス性感染症の大部分を占めるノーウォークウイルスを食品から直接検出することがはじめて可能になった。原因食品からウイルスを効率よく濃縮し、RT-PCR を組み合わせ高い検出効率が得られる系を開発する。電子顕微鏡に代わる抗原 ELISA を完成させ、キット化することによって 3-4 時間で結果が得られるようになり、迅速な行政対応が可能になる。抗体 ELISA はこれまで原因不明として処理されていた事例において、病原体を血清側から確認することを可能にする。病原体の同定は、PCR 産物の塩基配列を直接決定し、遺伝子系統解析から判断するのが最も確実に迅速であることが明らかになってきている。シーケンサーが相当普及した現在、定着しつつある基本的な手法である。これを支援するためのデータベースの整備と各研究機関からアクセスできるネットワークを構築することによって、各検査機関のレベルで分子系統解析が可能になる。統一した検査法を堅持するため、RT-PCR のプライマーおよびハイブリダイゼーションのプロブを供給する。わが国が世界に誇る検査技術レベルを高度に維持し、研究者間でのデータの相互比較を容易にするため、RT-PCR を含めこれらの検査法、解析法をマニュアル化する。

B. 研究方法

(1) 抗原 ELISA 法

モノクローナル抗体は G I を特異的に認識する NLV3912 を、また GII を特異的且つ広範囲に認識する NS14 を G I、GII NLV 抗原捕獲抗体としてマイクロプレート上に固着した。検出抗体として GI には r124, r258, rCV, r645 の 4 血清、GII には r104, r809, r18-3, r336, r754, r1876, r485, r47, r7K, r10-25 の 10 血清を用いた。糞便材料 10%懸濁液を 2~10°C

で 15000rpm、10 分間遠心、その上清を測定用検体とした。100ul づつをそれぞれ G I 及び G II プレートと室温で一時間反応させ、洗浄後標識抗 G I 及び抗 G II ウサギ IgG を加え、同様に一時間室温にて反応させた。洗浄後、基質液を加え 30 分後に波長 450/630nm の分光光度計で測定した。検体の指数が 1.0 以上を陽性、1.0 未満を陰性と判定した。全国 38 地方衛生研究所で本 ELISA キットを用いた測定が実施され、その結果が集積・解析された。材料は集団及び散発性食中毒事例の糞便 1,502 検体である。ELISA 法との比較検討に RT-PCR 法、電子顕微鏡 (EM) 法が用いられた。また、2 小児科医院より得られた主に冬季における下痢便のウイルス学的検索を目的とした 142 糞便検体、および NLV の保菌状態を検索する目的で、調理従事者及び一般健康人の糞便 664 検体について NLV 検索を行った。採取時期は 4 月から 10 月である。この検体は NLV の polymerase 領域である Yuri 系と NLV 系のプライマーセットを用いた RT-PCR 法でも測定された。

(2) ノーウォーク様ウイルス (NLV) 抗体 ELISA 法

精製した VLPs を抗原として 96 穴マイクロプレートにコーティングした。患者あるいは健康人血清をこのマイクロプレート上で 2 倍階段希釈し、パーオキシダーゼをラベルした抗ヒト IgM、および抗ヒト IgG を反応させた。基質 OPD の吸光度を測定し、カットオフ値を示す最高希釈倍数の逆数を血清抗体価とした。IgM 抗体測定には IgM 捕獲 ELISA も行い比較した。

(3) ノーウォーク様ウイルス (NLV) 高感度 RT-PCR 法の確立

某県内で給食弁当が原因の集団食中毒事例で、胃腸炎患者 9 名から採取された糞便 9 検体と弁当の残品 9 品目を使用した。RT-PCR 法と抗原検出 ELISA を用いて原因 NLV の遺伝子型を同定し、これと同じ遺伝子型の NLV 抗体結合磁気ビーズを調製した。食品の表面を精製水で洗い流した後、遠心して上清を回収した。

抗体結合磁気ビーズを加えて反応させた後、磁気ビーズから RNA を抽出した。糞便検査と同様の方法で RT-PCR を実施した。

(4) ノーウォーク様ウイルス (NLV)、およびその他の下痢症ウイルスの疫学および遺伝子解析

感染症発生動向調査病原体検査定点で主に小児の感染性胃腸炎患者から採取した検体を用いた。NLV と SLV は糞便の電子顕微鏡法 (EM) 及び RT-PCR で行った。RT-PCR は NLV を標的としたプライマーと SLV を標的としたプライマーを用いた。SLV の遺伝子解析は、PCR 産物のダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定し NJ 法により系統樹解析を行った。RV と Ad の検出は市販の EIA キットを用いた。Ast 検出も RT-PCR 法で行った。

(5) ロタウイルスの疫学および遺伝学的解析

下痢便の 10%懸濁液を作成し、ELISA によるサブグループ、G 血清型の型別に使用した。また、一部の検体については、MA-104 細胞に接種し、ウイルス分離を試みた。ロタウイルス dsRNA を調製し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を行い、RNA パターンを調べた。調製した RNA を鋳型とし、RT-PCR を行い、G 型、P 型を決定した。さらに、PCR 産物より、塩基配列の決定を行った。

(6) 新規ノーウォーク様ウイルス (NLV) の遺伝子解析とデータベースの整備

採取された NLV 感染患者糞便よりキアゲン社の Viral RNA kit を用いて抽出した RNA を鋳型として、Taqged Long RT-PCR で NLV ゲノム全長を互いに 200nt ほどオーバーラップするように 2 分割して増幅した。この増幅産物の塩基配列を primer walking 法を用いて決定した。さらに、リコンビネーションの確認された株は、株特異的な primer をゲノムの 5' 末端、3' 末端付近に合成し、これらを用いた long RT-PCR により約 7000nt を改めて増幅し、リコンビネーション部位付近の塩基配列を再決定した。

(7) ノーウォーク様ウイルス (NLV) 感染に

対する治療薬の創出

N 末端に His タグを導入した 3C 様プロテアーゼをコードするプラスミド (pUCHisPro) を大腸菌 BL21-CodonPlus⁻ RIL 株に導入し、IPTG 添加により発現を誘導した。菌体を超音波破砕後、超遠心により可溶性画分を調製した。この画分より TALON Metal Affinity Resin (Clontech) を用いて目的タンパク質 (HisPro) を精製した。結晶化条件は、Crystal Screen および Crystal Screen II (Hampton Research) を用い検討した。

C. 研究結果

(1) ノーウォーク様ウイルス (NLV) 抗原 ELISA 法の確立

NLV の構造蛋白領域遺伝子から発現された中空ウイルス様粒子に対するモノクローナル抗体を固相抗体とし、免疫ウサギ標識抗体を検出抗体として NLV 抗原検出 ELISA 法を構築した。全国地方衛生研究所での検出成績では、ポリメラーゼ領域を用いた RT-PCR 法との一致率は 69%、構造蛋白領域を用いた場合は 71% であった。本 ELISA は最初のスクリーニングの手段として有用であることが確認された。

(2) ノーウォーク様ウイルス (NLV) 抗体 ELISA 法の確立

患者の抗体側から原因ウイルスを同定するため、既に発現した 18 株のウイルス様中空粒子を抗原にして IgM 捕獲抗体検出法、ならびに高感度 IgG 検出系を検討した。病院内で発生した集団食中毒事件で採取された血清について検討し、有用性を確認した。

(3) ノーウォーク様ウイルス (NLV) 高感度 RT-PCR 法の確立

抗体を結合した磁気ビーズを用いて推定原因食品から NLV を回収した後に、RT-PCR を実施し、NLV の検出を試みた。残品食品 9 品目のうち、2 品目から NLV 遺伝子を検出することができた。また、PCR 産物の遺伝子解析の結果、食中毒患者糞便及び食品に由来する NLV は互いに遺伝学的に近縁な NLV であることが確認された。

(4) 下痢症ウイルスの疫学および遺伝子解析 (1)

地域社会における種々な下痢症ウイルスの流行状況を把握するため、1999年から2001年の散発性下痢症について電子顕微鏡法とRT-PCRを用いて、継続的病原検索を行った。その結果、患者数が多い冬季を中心に、Norwalk virus、Sapporo virusのカリシウイルス、ロタウイルス、アストロウイルス、腸管アデノウイルスが混在して流行していることが示された。特に、Sapporo virusがカリシウイルスの25%を占めていたことは注目され、今後のSapporo virus検査法の普及が課題として提起された。

(5) 下痢症ウイルスの疫学および遺伝子解析 (2)

小児急性胃腸炎患者について下痢症ウイルスの検索を行った結果、3年間で491名中376名(76.6%)からNLV、RV、Ad、SLV、Astを検出した。また、これらウイルス検出者の16.2%からは複数のウイルスを検出した。NLVの遺伝子型は3シーズンともGIIのLV型が最も多く、NLV検出数の60%以上を占めた。SLVの遺伝子型はSapporo型が最も多く検出された。

(6) 新規ノーウォーク様ウイルス(NLV)の遺伝子解析とデータベースの整備

現在までに全塩基配列が明らかにされたNLVは10株に満たない。本研究では新たにNLV 10株の完全長ジェノム塩基配列を決定し、遺伝子全長にわたる詳細な解析を行った。Similarity plot analysisの結果、NLVはORF1とORF2のジャンクション領域がもっとも高度に塩基配列が保存された領域であること、Similarity window analysisの結果、NLVはGI、GIIともにORF1とORF2のジャンクション領域でrecombinationを起こすことが確認された。また、統計学的手法を用いて分子系統解析を評価した結果、ORF1のポリメラーゼからORF2にコードされる構造蛋白N-terminal/shell domainにかけての塩基配列を用いてpairwise distanceを算出し、遺

伝子型別を行うと、組換え中空粒子の違いを反映した型別が可能であることが明らかとなった。

(7) ノーウォーク様ウイルス(NLV)の遺伝子解析

全国で発生した食品関連下痢症患者のふん便、推定原因食品およびカキ養殖海域からの海水から検出されたNLV257件の遺伝子型を明らかにした。わが国ではNLVのgenogroup 2がgenogroup 1よりも3倍程度多く、MXおよびYuri型が主流であった。多く検出された型は食品および海水から主として検出され、食品のウイルス汚染と食中毒様下痢症集団発生の関連性が強く示唆された。

(8) ロタウイルスの疫学および遺伝学的解析

ロタウイルスにはG1-G14のG血清型が存在する。G12ロタウイルスは1990年にフィリピンで初めて検出されて以来、世界でまったく検出されなかった。しかし、2001年に、タイの下痢症患者からG12特異性を有するウイルスが検出されたので、その性状を検討した結果、T152株は自然界で生成したリアソータン株であることが判明した。

(9) ノーウォーク様ウイルス(NLV)感染に対する治療薬の創出

チバウイルスが有する3C様プロテアーゼに着目し、遺伝子工学的手法によりその活性中心アミノ酸残基の同定とX線結晶構造解析による立体構造解明に向けて3C様プロテアーゼの結晶化を試みた。チバウイルス3C様プロテアーゼの活性中心はHis30とCys139の2残基で構成されるcatalytic dyadであることが明らかになった。

(10) ウイルス性下痢症診断マニュアルの整備

ノーウォーク様ウイルス(NLV)のRT-PCR法に関し、改訂版を作成した。

D. 考察

(1) ノーウォーク様ウイルス(NLV)抗原ELISA法の確立

集団発生、散発例を問わず、ウイルス性下痢症が発生した場合、まず初めにすることは患者便材料からのウイルス抗原検出である。あくまでも EM 法が標準法ではあるが、迅速性、容易さ、感度、費用の点からこれに変わる方法の開発が急務である。全国地方衛生研究所での検出成績から、特異性と感度に加えて多検体測定、測定方法の簡便さ、短時間測定は感染事例のスクリーニングテストとして有用である。さらに、NLV の疫学的研究、公衆衛生学的予防措置のツールとして十分に価値あるキットと考える。昨年秋から試験試薬として購入できる体制が整った。

(2) ノーウォーク様ウイルス (NLV) 抗体 ELISA 法の確立

患者糞便材料は集められないが血清は採取できるという場合が多く、抗体検出 ELISA の要望が多い。本抗体 ELISA 法によって抗体側から NLV 感染が証明できる事例をつかまえることが可能であったことから、迅速診断法のひとつとして有用である。

(3) ノーウォーク様ウイルス (NLV) 高感度 RT-PCR 法の確立

磁気ビーズを利用した Immunocapture RT-PCR 法で NLV の検出を試みた結果、残品食品 NLV 遺伝子を検出することができた。また、食中毒患者糞便及び食品に由来する NLV は遺伝学的に近縁な NLV であることも確認された。本法は食品からの簡便な NLV の検出法として、食中毒検査には極めて有用な方法であると考えられた。

(4) ノーウォーク様ウイルス (NLV)、およびその他の下痢症ウイルスの疫学および遺伝子解析

ウイルス性食中毒やウイルスによる胃腸炎集団発生の背景には、地域社会における種々なウイルスの流行が考えられ、疫学解析にはウイルスの継続的病原検索が必須である。食品関連下痢症で原因食品を特定するためには患者の糞便のみならず原因食品から直接病原体を検出する必要がある。また、カキ養殖海域の海水等、環境からのウイルス分離が今後の

重要な課題である。冬季を中心に流行する下痢症ウイルス、NLV、Sapporo virus のカリシウイルス、ロタウイルス、アストロウイルス、腸管アデノウイルスの混在流行が的確に把握できるようになった。

(5) ロタウイルスの疫学および遺伝学的解析

ロタウイルスの血清型の分布を把握することは、ロタウイルスの予防を考える上で重要である。2001年に、タイの下痢症患者から G12 特異性を有するウイルス T152 株は VP7 遺伝子と VP4 遺伝子の塩基配列から、自然界で生成したリアソータント株であることが判明した。今後わが国においても新たなロタウイルスがリアソータントとして出現する可能性は十分に考えられる。常に疫学監視と、それを支える診断技術を整備しておく必要があり、今回の解析手段の活用が期待される。

(6) 新規ノーウォーク様ウイルス (NLV) の遺伝子解析とデータベースの整備

NLV の疫学調査を推進し、NLV の流行予測や予防衛生を推進するためには、ウイルスの抗原性、ゲノム塩基配列の情報が必須である。特に RT-PCR の増幅産物を用いて直接塩基配列を解読し、系統解析によって同定しようとする場合、いかにしっかりしたデータベースをもっているかがポイントとなる。本研究班で開発した抗原 ELISA 法と組み合わせることによって、迅速な実験室診断が可能になった。

(7) ノーウォーク様ウイルス (NLV) 感染に対する治療薬の創出

チバウイルス 3C 様プロテアーゼの活性中心は His30 と Cys139 の 2 残基で構成される catalytic dyad であることが明らかになった。N 末端に His タグを導入した 3C 様プロテアーゼを大腸菌で発現させ、アフィニティ精製し、結晶化条件を検討したところ、2 M 硫酸アンモニウム、5% イソプロパノールを含む試薬で再現的に結晶成長が認められた。X 線結晶構造解析に用い、立体構造を解明する体制が整った。

(8) ウイルス性下痢症診断マニュアルの

整備

わが国の高度な下痢症ウイルス検出技術を維持するためには、実際の研究者が実験台において参照できるマニュアルを整備、適宜改定されたものを提供してゆく必要がある。下痢症ウイルスの多くは RNA を遺伝子に持つウイルスであるため高速に変異が遺伝子内に蓄積される。さらに同じ血清型のウイルスであっても地域ごとに遺伝学的に異ったウイルスが流行するのが常である。したがってマニュアルの内容を確実なものにするためには、わが国で分離されるウイルスについて遺伝学的、血清学的性状を常時監視し、それらを効率良く検出するための予備実験が不可欠である。NLV に関しては、本年度改定したマニュアルによって、RT-PCR 法およびハイブリダイゼーションによる同定法の確立と標準プロトコールの作成が完成した。ウイルス性食中毒の大部分を占める NLV の診断に、常に実験台の脇において活用されることが期待される。

E. 結論

RT-PCR 法と抗原 ELISA 法の確立、診断マニュアル作成と標準プロトコールの配布、プライマーとプローブの配布によって、NLV の検出はほぼ確立した。抗体 ELISA による診断も可能になった。しかしカキ以外の食品からの NLV 検出法は早急に開発する必要がある。SLV が新たな問題として登場し、SLV の遺伝子解析を推進する必要性が生じてきた。ロタウイルスの有効な予防法がみつき、NLV 治療薬開発の足がかりもできた。輸入海産物の衛生確保のために、監視体制を整備する必要がある。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Someya Y, Takeda N, Miyamura T: Identification of Active-Site Amino Acid Residues in the Chiba Virus 3C-Like Protease. *J. Virol.* 2002;76: in press.

2. Ishko H, Shimada Y, Yanoha M, Hashimoto O, Hayashi A, Sakae K, Takeda N: Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification using the VP4 sequence. *J. Infect. Dis.* 2002;185: 744-754.
3. Kitamoto N, Tanaka T, Natori K, Takeda N, Nakata S, Jiang X, Estes MK: Cross-reactivity among several recombinant calicivirus virus-like particles (VLPs) with monoclonal antibodies obtained from mice immunized orally with one type of VLP. *J. Clin. Microbiol.* 2002. in press.
4. Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, Natori K, Takeda N, Katayama K: Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods* 2002;100: 107-114.
5. Niikura M, Takamura S, Kim G, Kawai S, Saijo M, Morikawa S, Kurane I, Li T-C, Takeda N, Yasutomi Y: Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles as an oral vaccine vehicle presenting foreign epitopes. *Virology* 2002;293: 273-280.
6. Utagawa ET, Nakazawa E, Matsuo K, Oishi I, Takeda N, Miyamura T: Application of an automated specimen search system installed in a transmission electron microscope for the detection of caliciviruses in clinical specimens. *J. Virol. Methods* 2002;100: 49-56.
7. Li T-C, Takeda N, Miyamura T: Oral administration of hepatitis E virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *Vaccine* 2001;19: 3476-3484.
8. Lin K-H, Chern C-L, Chu P-Y, Cheng C-H, Wang H-L, Sheu M-M, Huang W-L, Pongsuwanna Y, Yamamoto S, Yoshino S,

- Ishiko H, Takeda N: Genetic Analysis of of Recent Taiwanese Isolates of a Variant of Coxsackievirus A24. *J. Med. Virol.* 2001;64: 269-274.
9. Magden J, Takeda N, Li T-C, Auvinen P, Ahola T, Miyamura T, Merits A, Kaariainen L: Virus-Specific mRNA Capping Enzyme Encoded by Hepatitis E Virus. *J. Virol.* 2001;75.
 10. Sasaki J, Kusuhara Y, Maeno Y, Kobayashi N, Yamashita T, Sakae K, Takeda N, Taniguchi K: Construction of an infectious cDNA clone of Aichi virus (a new member of the Family Picornaviridae) and mutational analysis of a stem-loop structure at the 5' end of the genome. *J. Virol.* 2001;75: 8021-8030.
 11. Sheikh S, Sugitani M, Kinukawa N, Moriyama M, Arikawa Y, Komiyama K, Li T-C, Takeda N, Ishaque SM, Hasan M, Suzuki K: Hepatitis E virus infection in fulminant hepatitis patients and apparently healthy population in Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg* 2002;in press.
 12. Tanaka E, Takeda N, Li T-C, Orii K, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Iijima T, Takayama T, Miyamura T, Yoshizawa K: Seroepidemiological study of hepatitis E virus infection in Japan using a newly developed antibody assay. *J. Gastroenterol.* 2001;36: 317-321.
 13. Pongsuwanna Y., Guntapong R., Chiwakul M., Tacharoenmuang R., Onvimala N., Wakuda M., Kobayashi N., and Taniguchi K. Detection of a human rotavirus with G12 and P[9] specificity in Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2002 (in press)
 14. Adah M. I. Abel W., Oseto M., Kuzuya K., and Taniguchi K. First detection of human group C rotaviruses in Nigeria and sequence analysis of their genes encoding VP4, VP6 and VP7 proteins. *J. Med. Virol.*, 66:269-275, 2002
 15. Takahashi K, Ohashi K, Abe Y, Mori S, Taniguchi K, Ebina T, Nakagomi O, Terada M, and Shigeta S. Protective Efficacy of a Sulfated Sialyl Lipid (NMSO3) against Human Rotavirus-Induced Diarrhea in a Mouse Model. *Antimicrob Agents Chemother.* 46:420-424, 2002
 16. Adah MI, Wade A, and Taniguchi K. Molecular epidemiology of rotaviruses in Nigeria: detection of unusual strains with G2P[6] and G8P[1] specificities. *J. Clin. Microbiol.* 39:3969-3975, 2001
 17. Takahashi K., Matsuda M., Ohashi K., Taniguchi K., Nakagomi O., Abe Y., Mori S., Sato N., Okutani K., and Shigeta S. Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. *Antiviral Res.*, 49:15-24, 2001
 18. Kobayashi N., Naik TN, Kusuhara Y. Krishnan T., Sen A., Bhattacharya SK, Taniguchi K, Alan MM, Urasawa T, and Urasawa S. Sequence analysis of structural and non structural proteins of a human group B rotavirus detected in Calcutta, India. *J. Med. Virol.*, 64:583-588, 2001
 19. Qiu-Hong Wang, Junko Kakizawa, Le-Ying Wen, Mitsugu Shimizu, Osamu Nishio, Zhao-Yin Fang, and Hiroshi Ushijima. Genetic Analysis of the Capsid Region of Astroviruses. *J. Med. Virology.* 64: 245-255, 2001.
 20. 新川奈緒美、上野伸宏、本田俊郎、吉国謙一郎、有馬忠行、湯又義勝、伊東祐治、増満弘史、田中義文、中野秀人、馬場俊行、中俣和幸、西尾 治：ウチムラサキ貝が原因で夏季に発生したノーウォーク様ウイルスによる食中毒事例—鹿児島県—。病原微生物検出情報, 22:222-223、2001

1. Someya Y, Takeda N, Miyamura K: Molecular cloning of the Chiba virus genome and functional expression of the 3C-like protein in E.coli. 6th International Symposium on Positive Strand RNA Viruses, Paris, France, 2001 May 28 - June 2.
2. Takeda N, Suzaki Y, Ami Y, Li T, Miyamura K: Recombinant hepatitis E virus-like particles as an oral vaccine. 6th International Symposium on Positive Strand RNA Viruses, Paris, France, 2001 May 28 - June 2.
3. Tanaka TN, Natori K, Kamada K, Kitamoto N, Utagawa E, Saito H, Shinozaki K, Okada M, Sakae K, Kobayashi S, Sawatari M, Nishi K, Yamasaki K, Seto Y, Hamano M, Oseto M, Matsuoka Y, Jiang X, Estes MK, Takeda N: Evaluation of a Norwalk-like virus antigen ELISA based on genogroup specific monoclonal antibodies : A multi-institutional analysis. , 2001.
4. ウイルス様中空粒子を用いたHIV経口ワクチンの開発。高村史記、新倉昌浩、武田直和、宮村達男、保富康宏。第49回日本ウイルス学会総会、大坂、2001 11月。
5. 磁気ビーズを利用したRT-PCRによる食品からのノーウォークウイルスの検出。小林愼一、榮賢司、鎌田公仁夫、佐藤俊則、名取克郎、武田直和。第49回日本ウイルス学会総会、大坂、2001 11月。
6. 河川水から検出されたNVの遺伝子解析。植木洋、有田富和、後藤郁男、佐藤千鶴子、沖村容、白石廣行、秋山和夫、橋本修、石古博昭、武田直和。第49回日本ウイルス学会総会、大坂、2001 11月。
7. Norwalk virus ゲノムリコンビネーションの解析。影山努、小嶋慈之、福士秀悦、星の文則、片山和彦、武田直和。第49回日本ウイルス学会総会、大坂、2001 11月。
8. 病院内で発生した集団胃腸炎事例でのNLVs核酸検出及び抗体価測定
関根雅夫、志田美奈子、勝見正道、熊谷正憲、早川安彦、吉田菊喜、小山由紀子、佐藤牧人、末武光子、遠藤廣子、名取克郎、武田直和。第49回日本ウイルス学会総会、大坂、2001 11月。
9. 単クローン抗体によるリコンビナントカリシウイルス粒子の共通エピトープの解析。北元憲利、武田直和、名取克郎、田中智之。第49回日本ウイルス学会総会、大坂、2001 11月。
10. 新しいノーウォーク様ウイルス抗原検出ELISA法の確立とその実用例。岩上泰雄、田中智之、鎌田公仁夫、内野清子、吉田永祥、北元憲利、名取克郎、武田直和。第49回日本ウイルス学会総会、大坂、2001 11月。
11. 動物細胞におけるノーウォーク様ウイルス中空粒子形成。田村克、名取克郎、武田直和、宮浦達男。第49回日本ウイルス学会総会、大坂、2001 11月。
12. チバウイルス3C様プロテアーゼの活性中心アミノ酸残基の同定。染谷雄一、武田直和、宮村達男。第49回日本ウイルス学会総会、大坂、2001 11月。
13. Norwalk-like virusesのキャプシド蛋白質、抗Norwalk-like viruses抗体遺伝子をそれぞれ発現する組換え植物の作出。松村健、一町田紀子、杉本千尋、大橋和彦、李成一、上田一郎、伊藤敬三、恒光裕、武田直和、田中智之。第49回日本ウイルス学会総会、大坂、2001 11月。
13. E型肝炎ウイルス組換え中空粒子の経口投与による感染防御抗体の誘導。李天成、網康至、須崎百合子、武田直和、宮村達男。第49回日本ウイルス学会総会、大坂、2001 11月。
14. ヒトライノウイルスの系統解析による迅速同定。三浦里香、武田直和、山崎修道、石古博昭。第49回日本ウイルス学会総会、大坂、2001 11月。
15. 急性胃腸炎の集団発生例及び散発例におけるSapporo virusの役割。大瀬戸光明、山下育孝、吉田紀美、近藤玲子、岡田峰幸、

- 篠崎邦子。第 49 回日本ウイルス学会、大阪市、2001、11 月。
16. Human astrovirus (HastV) のエピトープ解析。左近直美、大瀬戸光明、山崎謙治、大石功、奥野良信。第 49 回日本ウイルス学会、大阪市、2001、11 月。
 17. 新川奈緒美、永田告治、松野重夫、西尾 治、鹿児島県における胃腸炎集団発生事例および自生カキから検出された Norwalk virus の疫学的検討、第 42 回日本臨床ウイルス学会、2001、6、6-7、P70
 18. 李 蕾、清水英明、周玉梅、西尾 治、杉田久美子、上田勇一、西村修一、金保珠、西村忠史、黒岩利正、中谷茂和、牛島廣治、分子疫学的方法による小児下痢症アデノウイルスの検討、第 42 回日本臨床ウイルス学会、2001、6、6-7、P73、名古屋
 19. 川本 歩、加藤由美子、西尾 治：ヒトと環境水およびカキから検出した Norwalk virus の遺伝子解析、第 49 回日本ウイルス学会総会、2001、11、18-29、P. 83 大阪
 20. 西尾 治、加藤由美子、秋山美穂、辰巳正純、本間真二郎、中田修二、磯村思无、パキスタンの乳幼児からの NV および SV 検出状況、第 49 回日本ウイルス学会総会、2001、11、18-29、P. 88、大阪
 21. 李 蕾、清水英明、西尾 治、沖津祥子、牛島廣治、1999 年—2000 年日本での小児下痢症におけるアデノウイルスの検討、第 49 回日本ウイルス学会総会、2001、11、18-29、P. 90、大阪
 22. Grant Hansman, Doan Lan, Shoko Okitu, Osamu Nishio, Yumiko Kato, Hiroshi Ushijima, Sporadic cases of Norwalk-like virus infection in Vietnam reveal two distinct cluster in Genogroup II、第 49 回日本ウイルス学会総会、2001、11、18-29、P. 89、大阪
 23. Doan Thi Phuong Shoko Okitsu, Osamu Nishio, Hiroshi Ushijima, Distribution of rotavirus G serotype among hospitalized children of Ho Chimin city, Vietnam, 第 49 回日本ウイルス学会総会、2001、11、18-29、P. 213、大阪
 24. [Overview：ピコルナウイルス] 遺伝子の多様性と病原性。武田直和。第 49 回日本ウイルス学会総会、大阪、2001 11 月。
 25. 食品中のノーフォークウイルスの検出—磁気ビーズを用いた Immunocapture RT-PCR 法の試み—。小林慎一、柴 賢司。第 42 回日本臨床ウイルス学会、名古屋、2001
 26. 染谷雄一、武田直和、宮村達男 「チバウウイルスプロテアーゼの活性中心アミノ酸残基の同定」第 74 回日本生化学会大会 2001 年 10 月 25-28 日 京都
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

モノクローナル抗体を用いたノルウォーク様ウイルス検出 ELISA 法の確立に関する研究

分担研究者 田中智之 (堺市衛生研究所)

共同研究者 北元憲利 (姫路工業大学 環境人間学部)

共同研究者 名取克郎、武田直和 (国立感染症研究所 ウイルス II 部)

ノルウォークウイルスのカプシド領域遺伝子から発現されたウイルス様粒子に対するモノクローナル抗体を固相抗体とし、免疫ウサギ標識抗体を検出抗体として NLV 抗原検出 ELISA 法を構築した。全国地方衛生研究所での検出成績では、Polymerase 領域を用いた RT-PCR 法との一致率は 69%、Capsid 領域を用いた RT-PCR 法との一致率は 71%であった。

これらの特異性と感度に加えて多検体測定、測定方法の簡便さ、短時間測定は感染事例のスクリーニング テストとして有用である。さらに、NLV の疫学的研究、公衆衛生学的予防措置のツールとして十分に価値あるキットと考える。

A. 研究目的

厚生労働省報告による小型球形ウイルスによる食中毒は、平成 10 年度では、123 件 (食中毒総件数の 4.2%)、患者数 5,213 人 (患者総数の 12.1%)、平成 11 年度、116 件 (食中毒総件数の 4.3%)、患者数 5,217 人 (患者総数の 14.8%)、平成 12 年度 245 件 (食中毒総件数の 10.9%)、患者数 8,080 人 (患者総数の 18.7%)であった。しかし、これらの報告数は氷山の一角とも言われている。

この報告にも見られるように、年次的な患者数の増加と事例発生件数に比べ発症患者数が多いのがウイルス性食中毒の特徴である。

ノルウォークウイルス (NV) のウイルス学的診断方法は、電子顕微鏡 (EM) による観察が基本となっている。しかし、感度の問題、検出時間の問題、設

備の問題、そして何よりも熟練した観察力のある人が不可避であるという短所がある。

Xi Jiangらによる NV 遺伝子の決定、以来、とくに NV の遺伝子学的診断方法の開発は進み、ポリメラーゼ領域のプライマーを用いた RT-PCR 法の開発はウイルス学的診断として広く浸透し、優れた特異性を発揮し現在に至っている。しかし、この方法も高価な試薬、機器の整備、検出時間や多検体処理の問題、コンタミネーションの可能性の排除など検討課題も多く、NV 検査には高感度、高い特異性を持ち、短時間で且つ多検体診断できるキット必要である。

前年度の報告のように、田中らの作製した VLPs に対して広範囲に共通抗原を認識するモノクローナル抗体と、武田らの NLV-VLPs に対する高力価

ウサギ免疫抗血清を配合した NLV 検出キットは Genogroup I (G I) と Genogroup II (G II) をそれぞれ検出でき、昨年度、全国地方衛生研究所に配布し、特異性、感度、利便性などの結果について解析した。

今回、その最終解析結果を報告し、併せて一般実地医療機関でのキット有用性についての検討成績を報告する。

B. 研究方法

a. モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は G I を特異的に認識する NV3912 を、また G II を特異的且つ広範囲に認識する NS14 を用いた。

b. ウサギ高力価免疫血清

作製された高力価免疫血清のうち、G I には r124, r258, rCV, r645 の 4 血清、G II には r104, r809, r18-3, r336, r754, r1876, r485, r47, r7K, r10-25 の 10 血清を用いた。

c. ELISA 法の構築

モノクローナル抗体を G I、G II NLV 抗原捕獲抗体としてマイクロプレート上に固層した。検出抗体として上記の G I 4 株、G II 10 株の標識免疫ウサギ抗体を用いた。実際的には、糞便材料 10%懸濁液を 2~10℃で 15000rpm、10 分間遠心、その上清を測定用検体とした。100ul づつをそれぞれ G I 及び G II プレートと室温で一時間反応させ、洗浄後標識抗 G I 及び抗 G II ウサギ IgG を加え、同様に一時間室温にて反応させた。洗浄後、基質液を加え 30 分後に波長 450/630nm の分光光度

計で測定した。検体の指数が 1.0 以上を陽性、1.0 未満を陰性と判定した。

d. 測定検体

1) 全国 38 地方衛生研究所で本 ELISA キットを用いた測定が実施され、その結果が集積・解析された。材料は集団及び散发性食中毒事例の糞便 1,502 検体である。ELISA 法との比較検討に RT-PCR 法、電子顕微鏡 (EM) 法が用いられた。

2) 2 小児科医院より得られた主に冬季における下痢便のウイルス学的検索を目的とした 142 糞便検体を用いた。

3) NLV の保菌状態を検索する目的で、調理従事者及び一般健康人の糞便 664 検体について NLV 検索を行った。採取時期は 4 月から 10 月である。この検体は NV の polymerase 領域である Yuri 系と NV 系のプライマーセットを用いた RT-PCR 法でも測定された。

C. 研究結果

1. 地方衛生研究所の測定結果

定義: 全国地方衛生研究所 (地衛研) で測定した ELISA キット、RT-PCR 法および電子顕微鏡検索結果の評価判定を次のように定めた。すなわち、ELISA キットでは G I、G II いずれかが陽性と判定された検体を陽性とした。RT-PCR 法では各地衛研で様々なプライマーセット用いて測定されているため、いずれかのプライマーで陽性となった検体を陽性と判定、使用した全てのプライマーセットが陰性になった検体を陰性と判定し解析した。

一方、EM 判定は鏡検上、明らかなウイルス診断が出来た場合のみならずウイルス様粒子いわゆる SRSV がみとめられた場合も EM 陽性とした。

1) ELISA 法と polymerase 領域をもちいた RT-PCR 法の一致率は 69.4%であった (表 1)。ELISA (+) RT-PCR (-) 検体はわずか 5%で非特異的反応の可能性が示唆された。ELISA (-) RT-PCR (+) は 26%で、両方法の感度差によるものと考えられた。

2) ELISA 法と EM 法の一致率は 68%であった (表 2)。非特異的反応、感度差は両方とも約 16%にみられた。

3) EM 法と RT-PCR 法の一致率は 58%と低かった (表 3)。非特異的反応、感度差とも両方法に大きな解離がみられた。3割近くの EM (-) RT-PCR (+) は、EM によるウイルス様粒子検出の困難さを示している。また EM (+) RT-PCR (-) の 12%は NLV でない他のウイルスの存在を示唆している。

4) 同一糞便検体を ELISA 法、Polymerase 領域、および Capsid 領域を用いた RT-PCR 法、そして EM 法の 3 法で測定できた検体について測定感度の比較検討を加えた。EM 陽性検体は 128、陰性は 16 検体であった (表 4)。

EM 陽性検体での検出率は ELISA 法、Capsid PCR 法、Polymerase PCR 法でそれぞれ 68%、70%、55%であった。一方、EM 陰性検体ではそれぞれ 31%、88%、56%の検出率を示した。

2. 小児科医院材料の測定結果 (表 5)。

ELISA 法と RT-PCR 法の一致率は

90.1%であった。ELISA 法のみでは陽性率 11.3%、RT-PCR 法のみでは陽性率 20.4%であった。

3. 一般健康人糞便材料の測定結果 (表 6)

664 検体中、調理従事者一人 (約 0.2%) は ELISA キット、RT-PCR 法で陽性であった。NLV ウイルスキャリアーが示唆された。一般健康人は陰性であった。ELISA 法に約 4%の非特異的反応が見とめられた。

D. 考察

NLV は世界的にも食中毒原因ウイルスとして占める比重は大きい。食中毒を含む NLV 感染予防にはその検査方法が大きく左右している。測定方法は普遍的でなければならないが、現在の使用されている方法は多種多様で、簡便さ、測定感度、特異性、測定時間そして測定経費など検証すべき点は多い。

特異性については、筆者らが作製したモノクローナル抗体は、それぞれ GI と GII の 58Kd ウイルス蛋白と反応する抗体で、何よりも多くの VLPs との交差反応性が認められている点が特徴である。しかし、ORF2 の塩基配列の比較から NLV カプシド蛋白には共通抗原が存在し、今回のモノクローナル抗体がこれら全てと反応しているわけではなく、感度を高める意味では更なる共通抗原認識のモノクローナル抗体の作製が必要である。

NLV 抗原検出 ELISA 法の開発は、筆者以外にもいくつか試みられている

が、今回のモノクローナル抗体と免疫ウサギ血清のコンビネーションによる新しい ELISA 法は RT-PCR 法との一致率が 69%に上昇し、現時点では、高い特異性と感度を持つ方法であることが判明した。さらにカプシド領域のプライマーを用いれば RT-PCR 法との比較では 71%の一致率を示した。非特異的反応が約 5%内外に抑えられ点もこれまでの方法より優れている。

今回の集計結果からも各地衛研に使用方法の偏りは見られず、得られた結果は比較的安定していたと思われる。

この ELISA 法の開発による利点は、

- ①測定上の困難さや特別な機器を設備する必要性はなく、多検体を短時間に測定できる。従って、食中毒集団発生事例においても、細菌性食中毒との鑑別のみならず、時間的にも十分対応出来る。
- ② ウイルス性胃腸炎の大規模な疫学調査が可能である。今回の健常人の糞便検査においても調理従事者に NLV キャリアーの存在が確認された。食品に携わる人々に行われる現行の定期検査は腸管出血性大腸菌 157、チフス菌、赤痢菌の 3 種類であるが、NLV 検査を新たに加えるべき必要性が明確になったといえる。
- ③細菌性食中毒以外に原因が特定

表 1 ELISA 法と RT-PCR 法の比較

		+	-
法	ELISA 法	814	73
	RT-PCR 法	387	228

できない胃腸炎感染事例が、小学校、病院での院内感染、老人施設などで増えている。このような事例においても早期診断、感染経路の解明にこの測定キットの持つ意義は大きい。

一方、

- ④ この測定キットの感度は PCR 法に比べ十分でないことも判明した。今後更なる感度と特異性の向上が求められることも判明した。

E. 結語

開発された ELISA 法の多施設での測定結果の解析では、感度と特異性は polymerase 領域のプライマーを用いた RT-PCR 法との一致率では約 69%ではあった。Capsid 領域のプライマーを用いると 71%の一致率を示した。ELISA 法は EM 法、RT-PCR 法に比べ、多検体を簡便かつ経済的、短時間で測定できる利点がある。食中毒事例における初期対応検査、スクリーニングテストとしても有用である。

今回測定し得た健康人検体で、調理従事者に NLV キャリアーの存在が確認された。食中毒の感染源となり得る可能性があり今後の定期的細菌検査に加え NLV 検査も行う必要性が示唆された。

感度と特異性の向上は今後のさらなる課題として尚改良中である。

一致率：1,042/1,502 (69.4%)

ELISA(+)/ RT-PCR(-) : 73/1,502 (4.8%)

ELISA(-)/ RT-PCR(+) : 387/1,502 (25.8%)

表2 ELISA法とEM法の比較

		EM法	
		+	-
ELISA法	+	348	115
	-	111	123

一致率：471/697 (67.6%)

ELISA(+)/ EM(-) : 115/697 (16.5%)

ELISA(-)/ EM(+) : 111/697 (15.9%)

表3 EM法とRT-PCR法の比較

		RT-PCR法	
		+	-
EM法	+	354	89
	-	200	51

一致率：405/694 (58.4%)

EM(+)/ RT-PCR(-) : 89/694 (12.8%)

EM(-)/ RT-PCR(+) : 200/694 (28.8%)

表4 同一検体を用いたELISA法、RT-PCR法、EM法の比較

	ELISA	RT-PCR
G. 研究発表		
2. 学会発表		

	Capsid			Polymerase			
	I	II	I/II	I	II	I/II	
EM陽性+	7	68	12	18	60	11	70
-	109	48		99	57		58
EM陰性+	4	1		9	5		9
-	12	16		7	11		7

(I/IIは重複陽性を含む)

む)

表5 小児科医院のELISA法とRT-PCR法の比較

		RT-PCR法	
		+	-
ELISA法	+	16	1
	-	13	112

一致率：128/142 (90.1%)

ELISA(+)/ RT-PCR(-) : 1/142 (0.7%)

ELISA(-)/ RT-PCR(+) : 13/142 (9.2%)

表6 一般健康人のELISA法とRT-PCR法での検出率

		RT-PCR法	
		+	-
ELISA法	+	1	24
	-	0	639

一致率：640/664 (96.4%)

ELISA(+)/ RT-PCR(-) 24 / 664 (3.6%)

ELISA(-)/ RT-PCR(+) 0 / 664

1. 田中智之、名取克郎、鎌田公仁夫、北元憲利、斎藤博之、

- 宇田川悦子、篠崎邦子、岡田峰幸、栄 賢司、小林慎一、猿渡正子、西 香南子、山崎謙治、瀬戸祥介、濱野雅子、大瀬戸光明、松岡由美子、武田直和
新しいカリシウイルス抗原検出 ELISA 法の評価
第 42 回日本臨床ウイルス学会, 2001, 6 月、名古屋
2. 田中智之、武田直和、名取克郎、宇田川悦子、鎌田公仁夫、北元憲利、斎藤博之、篠崎邦子、岡田峰幸、栄 賢司、小林慎一、猿渡正子、西 香南子、山崎謙治、瀬戸祥介、濱野雅子、大瀬戸光明、松岡由美子
NLV 検出用 ELISA キットの評価と血清型
衛生微生物技術協議会第 22 回研究会, 2001, 7 月、徳島
3. Tomoyuki Tanaka, Katsuro Natori, Kunio Kamata, Noritoshi Kitamoto, Etsuko Utagawa, Hiroyuki Saito, Kuniko Shinozaki, Mineyuki Okada, Kenji Sakae, Shinichi Kobayashi, Masako Sawatari, Kanako Nishi, Kenji Yamasaki, Yoshiyuki Seto, Masako Hamano, Mitsuaki Oseto, Yumiko Matsuoka, Xi Jiang, Mary 公仁夫、内野清子、吉田永祥、北元憲利、名取克郎、
- K. Estes and Naokazu Takeda: Evaluation of a Norwalk-like virus antigen ELISA based on genogroup-specific monoclonal antibodies: A multi-institutional analysis
US-Japan Cooperative Medical Science Program. 35th Joint Working Conference on Viral Diseases. 2001, August, Hawaii, USA
4. 北元憲利、武田直和、名取克郎、田中智之
単クローン抗体によるリコンビナントカリシウイルス粒子の共通エピトープ解析
第 49 回日本ウイルス学会学術集会総会, 2001, 11 月、大阪
5. 李 成一、吉田玲子、大橋和彦、大屋賢司、小沼 操、上田一郎、松村 健、伊藤敬三、杉本千尋、田中智之、北元憲利
抗 Norwalk virus 抗体遺伝子のバキュロウイルス発現系の確立
第 49 回日本ウイルス学会学術集会総会, 2001, 11 月、大阪
6. 田中智之、岩上泰雄、鎌田武田直和
新しいノルウォーク様ウイルス

ス抗原検出 ELISA 法の確立と
その実用例

第 49 回日本ウイルス学会学
術集会総会、2001. 11 月、大
阪

7. 松村 健、一町田紀子、杉本
千尋、大橋和彦、李 成一、
上田一郎、伊藤敬三、恒光 裕、
武田直和、田中智之
Norwalk-like virus のキャプ
シド蛋白質、抗 Norwalk-like
virus 抗体遺伝子をそれぞれ
発現する組み換え植物の作出
第 49 回日本ウイルス学会学
術集会総会、2001. 11 月、大
阪
8. 濱野雅子、藤井理津志、葛谷
光隆、小倉 肇、田中智之、
鎌田公仁夫、北元憲利
Norwalk virus の Capsid 領域
PCR 法と新たに開発された抗
原検出 ELISA 法の評価

第 71 回日本感染症学会西日
本地方会総会、2001. 11 月。
岡山

9. 田中智之
カキとウイルス性食中毒 特
にカリシウイルス (旧称 SRSV)
のウイルス学的、疫学的特徴
第 29 回生物資源開発センター
セミナー「食べ物に潜む病原体
－危険性と対応策－」2001.
11 月。大阪府立大学先端科学
研究所生物資源開発センター

(新しい NLV 抗原検出 ELISA 法
について測定データの提供、コ
メントを戴いた全国地方衛生
研究所の先生方に深謝いたし
ます。)

研究要旨

ロタウイルスの血清型の分布を把握することは、ロタウイルスの予防を考える上で重要である。ロタウイルスには G1~G14 の G 血清型が存在する。G12 ロタウイルスは 1990 年にフィリピンで初めて検出されて以来、世界でまったく検出されなかった。しかし、2001 年に、タイの下痢症患児から G12 特異性を有するウイルスが検出されたので、その性状を検討した。T152 株は、フィリピンでの G12 株 (L26 株; G12P[9]) と同様、サブグループ I 特異性を有し、RNA パターンは Long であった。VP7 遺伝子の塩基配列を決定し、主要なロタウイルスの配列と比較したところ、G12 の L26 株と、塩基配列で 90.9%、アミノ酸配列で 93.9% ともっとも高い相同性を示した。一方、VP4 遺伝子については、ヒトおよびネコロタウイルスで知られている P[9] 特異性を有する株の配列と、塩基配列で 89.3%~90.6%、アミノ酸配列で 93.9%~95.6% の高い相同性を示した。以上の結果から、T152 株は自然界で生成したりアソータント株であることが判明した。

1) 研究目的

下痢症ウイルスは多様性に富み、ロタウイルス、ノロウイルス、サッポロ様ウイルス、アストロウイルス、アイチウイルス、アデノウイルス、コロナウイルス、ピコビルナウイルスなどが報告されている。その中でロタウイルスが最も検出頻度が高く、重篤度も高い。ロタウイルスには動物を含めると A~G 群が存在するが、ヒトでは A, B, C 群が検出されている。A 群ロタウイルスの血清型には、VP7 および VP4 の 2 種の外層蛋白質によって規定される G 血清型および P 血清型が存在する。G 血清型は 14 種、P 型には 21 種報告されている。血清型の分布を把握することは、ワクチン開発のための基礎データを提供する意味で重要である。これまで、日本および東南アジアを中心として、血清型の分布を調査してきたが、本研究において、興味深い成績を得た。

G12 血清型は、1990 年にフィリピンの乳幼児で初めて検出されたが、それ以来、ヒトでも動物でもまったく検出されなかった。しかしながら、10 年以上を経た 2001 年にタイの下痢患者から検出され、培養細胞での分離も成功した。この G12 のヒトロタウイルスが、どのような変異の結果生じたかを、遺伝子の配列を決定することにより検討した。

2) 研究方法

タイにおいて、405 例の下痢便を収集した。10%懸濁液を作成し、ELISA によるサブグループ、G 血清型の型別に使用した。また、一部の検体については、MA-104 細胞に接種し、ウイルス分離を試みた。

ロタウイルス dsRNA を調製し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を行い、RNA パターンを調べた。

調製した RNA を鋳型とし、RT-PCR を行い、G 型、P 型を決定した。さらに、PCR 産物より、塩基配列の決定を行った。

3) 研究結果

3-1) 405 例を RNA-PAGE によりスクリーニングを行ったところ、194 例がロタウイルス陽性であった。1stPCR では、DNA バンドが検出されたものの、2ndPCR ではまったく DNA の増幅が見られなかった検体について、一部の塩基配列を決定したところ、1つの検体 (T-152) が G12 型であることが示唆された。

3-2) T-152 は、ELISA により、サブグループは I であったが、G1~G 4 に特異的な ELISA ではまったく反応せず、RNA パターンは Long であった (図 1)。

3-3) T-152 は MA-104 細胞に馴化し、ウイルス株 (T-152 株) を分離した。RNA パターンの比較の結果、便材料と感染細胞由来のウイルス RNA パターンはまったく同一であった。

3-4) VP7 遺伝子の全塩基配列を決定したところ、1,062 塩基で 326 アミノ酸をコードしていた。塩基配列およびアミノ酸配列を他の G 血清型のロタウイルスと比較した結果、G12 である L26 株と塩基配列で 90.0%、アミノ酸配列で 93.9% の相同性を示した (表 1)。3 箇所の抗原部位 (B, D, E) での相同性は、L26 株とは、92.3% で、他の G 血清型とは 35.9~53.8% であり、T-152 株が G12 血清型を有することが示された (図 2)。

3-5) VP4 遺伝子の全塩基配列を決定したところ、2,359 塩基で 775 アミノ酸をコードしていた。P[8], P[4] および P[6] 特異性を有するヒトロタウイルスと異なり、アミノ酸 No. 135 に 1 アミノ酸が欠失し、アミノ酸 No. 575 に 1 アミノ酸が挿入されていた。この遺伝子構造は P[9] ヒトロタウイルスに見られるものである。

塩基配列およびアミノ酸配列を他の P 型のロタウイルスと比較検討した。その結果、P[9] ロタウイルスと、塩基配列で、89.3%~90.6%、アミノ酸配列で、93.6%~95.6% であった (表 2)。

3-6) VP4 遺伝子の VP8* コード領域の系統関係を調